



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

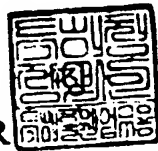
출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0109149 호  
Application Number 10-2004-0109149

출 원 년 월 일 : 2004년 12월 21일  
Date of Application DEC 21, 2004

출 원 인 : 주식회사 삼양제넥스  
Applicant(s) SAMYANG GENEX CORPORATION

2005 년 1 월 10 일

특 허 청  
COMMISSIONER



【서지사항】

1. 류명] 특허출원서  
 2. 리구분] 특허  
 3. 신처] 특허청장  
 4. 출원지] 2004.12.21  
 5. 명의 명칭] 식물 세포 배양에서 알카노산 또는 이의 염을 이용한 이  
 차 대사산물의 대량 생산방법  
 6. 명의 영문명칭] Method for mass production of secondary metabolites  
 in plant cell culture by treatment of an alkanolic  
 acid or salt thereof  
 7. 출원인] 주식회사 삼양제넥스  
 8. 명칭] [출원인코드] 1-1998-002549-0  
 9. 리인] 유미특허법인  
 10. 명칭] 9-2001-100003-6  
 11. 대리인코드] 김원호  
 12. 지정문변리사] 2001-050798-5  
 13. 포괄위임등록번호] [성명의 국문표기] 김창현  
 14. 명자] KIM, CHANG HEON  
 15. 성명의 영문표기] 680514-1845817  
 16. 주민등록번호] 301-779  
 17. 우편번호] 대전 중구 태평1동 유등마을아파트 104동 602호  
 18. 주소] KR  
 19. 국적] [성명의 국문표기] 손주선  
 20. 성명의 영문표기] SON, JOO SUN  
 21. 주민등록번호] 690918-1552416  
 22. 우편번호] 302-768  
 23. 주소] 대전 서구 탄방동 한우리아파트 105동 303호  
 24. 국적] KR

발명자]  
【성명의 국문표기】 김진아  
【성명의 영문표기】 KIM, JIN AH  
【주민등록번호】 760923-2537112  
【우편번호】 580-050  
【주소】 전북 정읍시 상동 주공아파트 6동 304호  
【국적】 KR

발명자]  
【성명의 국문표기】 윤정환  
【성명의 영문표기】 YUN, JEONG HWAN  
【주민등록번호】 700203-1068613  
【우편번호】 302-777  
【주소】 대전 서구 둔산2동 샘머리아파트 104동 1004호  
【국적】 KR

발명자]  
【성명의 국문표기】 나광휘  
【성명의 영문표기】 NA, GWANG HWEE  
【주민등록번호】 670217-1550714  
【우편번호】 305-752  
【주소】 대전 유성구 송강동 송강청솔아파트 207동 905호  
【국적】 KR

발명자]  
【성명의 국문표기】 송재영  
【성명의 영문표기】 SONG, JAI YOUNG  
【주민등록번호】 631007-1408316  
【우편번호】 302-782  
【주소】 대전 서구 심전동 국화아파트 201동 506호  
【국적】 KR

발명자]  
【성명의 국문표기】 최호준  
【성명의 영문표기】 CHOI, HO JOON  
【주민등록번호】 611025-1066812

[우편번호] 305-728  
 [주소] 대전 유성구 전민동 세종아파트 103동 406호  
 [국적] KR  
 [우선권주장] KR  
 [출원국명] 특허  
 [출원종류] 10-2003-0101757  
 [출원번호] 2003.12.31  
 [출원일자] 첨부  
 [증명서류] 청구  
 [심사청구] 특허법 제42조의 규정에 의한 출원. 특허법 제60조의 규  
 [비고] 정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
 유미특허법인 (인)  
 [수수료]  
 [기본출원료] 0 면 38,000 원  
 [가산출원료] 30 면 0 원  
 [우선권주장료] 1 건 20,000 원  
 [심사청구료] 12 항 493,000 원  
 [합계] 551,000 원  
 [부서류] 1. 우선권증명서류 원문[특허청기제출] 1종

【요약서】

【약】

본 발명은 식물세포배양에서 이차대사산물을 대량 생산하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 배양 배지에 알카노산 또는 이의 염을 처리하여 식물세포를 배하는 단계들 포함하는 이차대사산물의 생산방법에 관한 것이다. 본 발명은 식물세포로부터 이차대사산물을 대량 생산할 수 있는 방법을 제공함으로써 유용한 이차대사산물의 생산 산업화에 기여할 수 있다.

【표도】

도 4

【인어】

출세포, 이차대사산물, 알카노산

【명세서】

발명의 명칭

식물 세포 배양에서 알카노산 또는 이의 염을 이용한 이차 대사산물의 대량 생산 방법 [Method for mass production of secondary metabolites in plant cell culture by treatment of an alkenoic acid or salt thereof]

도면의 간단한 설명

도 1a는 텍서스 취넨시스 (*Taxus chinensis*) 세포주 SYG-1의 배양 7일 후 소듐 부티레이트를 0 내지 10 mM로 처리한 다음 세포 건조중량을 측정하여 나타낸 것이다

도 1b는 텍서스 취넨시스 세포주 SYG-1의 배양 7일 후에 소듐 부티레이트를 0 내지 10 mM로 처리한 다음 파클리락셀의 생산 양상을 분석한 것이다.

도 1c는 텍서스 취넨시스 세포주 SYG-1의 배양 후 7일에 0, 1 및 5 mM의 소듐 부티레이트를 각각 배양 배지에 처리한 후 배양한 SYG-1의 게놈 DNA를 전기영동한 것이다.

도 2a는 텍서스 취넨시스 세포주 SYG-1의 배양 시기에 따라 1.0 mM의 소듐 부티레이트를 처리하고, 배양한 SYG-1의 세포건조중량의 변화를 나타낸 것이다.

도 2b는 1.0 mM의 소듐 부티레이트의 처리 시기에 따른 텍서스 취넨시스 세포 SYG-1의 파클리락셀의 생산 양상을 나타낸 것이다.

도 3은 소듐 부티레이트의 반복 처리에 따른 텍서스 취넨시스 세포주 SYG-1로부터 생산되는 파클리락셀을 측정된 결과이다.

도 4는 소듐 부티레이트의 처리에 따른 텍서스 취넨시스 세포주 SYG-1로부터 산되는 텍센 화합물을 측정된 결과이다.

도 5a는 소듐 프로피오네이트의 처리에 따른 텍서스 취넨시스 세포주 SYG-1의 포건조중량의 변화를 나타낸 것이다.

도 5b는 소듐 프로피오네이트의 처리에 따른 텍서스 취넨시스 세포주 SYG-1로 생산되는 파클리탁셀을 측정된 결과이다.

도 6은 소듐 포르메이트 (SF), 소듐 아세테이트 (SA), 소듐 프로피오네이트 (SP), 소듐 부티레이트 (SB) 또는 발레르산 (VA) 이 1 mM 첨가된 배지에서 배양한 텍서스 취넨시스 SYG-1 세포의 파클리탁셀의 생산량을 나타낸 것이다.

도 7a 및 b는 비파 현탁배양액과 0.5 mM의 소듐 부티레이트에서 배양한 비파 탁배양액의 HPLC 차트이다.

발명의 상세한 설명]

발명의 목적]

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술]

본 발명은 식물세포배양에서 이차대사산물을 대량 생산하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 식물 세포를 배양할 때 배양 배지에 알카노산 및 알카노산의 염 처리함으로써 식물세포의 성장을 촉진하고 이차대사산물의 생산성을 향상시키는 것을 특징으로 하는 식물세포배양을 이용한 이차대사산물의 제조 방법에 관한 것이다

식물은 의약품, 농약, 향신료, 색소, 식품 첨가물, 화장품 등으로 사용되는 넓은 이차대사산물을 생산하는 유용한 자원이다 (표 1). 그러나 다양한 산업 분야에서 이차대사산물에 대한 수요가 증가하는 추세인 반면 식물로부터의 직접적인 생산 통한 공급은 제한이 있기 때문에 이러한 식물 기원 이차대사산물을 식물세포배양 술을 이용하여 산업적으로 대량 생산하려고 하는 시도가 있어 왔다 (Stockigt et al., Plant Cell Tissue Org. Cult. 43: 814-820, 1995).

표 1)

terpenoids	Alkaloids	terpenoids	Quinones	Steroids
Anthocyanins	Acridines	Carotenes	Anthraquinones	Cardiac
Coumarins	Betalains	Monoterpenes	Benzoquinones	Glycosides
Flavonoids	Quinolizidines	Sesquiterpenes	Naphthoquinones	Pregnenolone
hydroxycinnamoyl derivatives	Furanoquinones	Diterpenes		Drivatives
Isoflavonoids	Harringtonines	Triterpenes		
Lignans	Isoquinolines			
Phenolenones	Indoles			
roanthocyanidins	Purines			
Stilbenes	Pyridines			
Tanins	Tropene			
	Alkaloids			

그러나 식물세포배양에 있어서 배양 세포주의 불안정성, 낮은 생산성, 느린 성장과 대량 배양 (scale-up)의 문제 등으로 인하여 식물세포배양을 이용한 이차대사산물의 대량 생산은 여전히 어려움을 겪고 있다.

식물세포배양의 낮은 생산성을 극복하기 위하여 여러 가지 노력이 시도된 바 있으며, 이러한 시도에는 1) 당, 질산염, 인산염, 성장조절제, 전구체의 첨가 등과 같은 배양 배지의 영양 물질 조작; 2) 배양 온도, 조명, 배지의 pH, 진탕 및 통기 조건 등과 같은 배양 환경의 최적화; 3) 생산성을 증가시키기 위한 유도제 (elicitor)의 리; 4) 이차대사산물의 효과적인 회수를 위한 세포막의 투과성화



ermeabilization)와 이원상 배양 (two-phase culture): 5) 이차대사산물의 생합성  
관여하는 유전자들 변형하거나 외래 유전자들 도입하여 이차대사산물의 생산성을  
가시키는 대사공학 등의 방법이 있다. 그러나 이러한 시도들은 특정 식물세포 혹은  
특정 이차대사산물에만 한정되어 긍정적인 결과를 얻었으며, 대다수의 식물세포배  
과 이차대사산물에 일반적으로 적용될 수 있는 방법은 아직 확립되지 않았다.

자연계에서 식물은 병원체의 공격에 대한 방어 기작으로서 이차대사산물을 생산  
며, 일부 식물세포배양에서도 병원체로부터 유래한 물질(유도제, elicitor)에 의해  
이차대사산물의 생산이 촉진된다는 것이 보고된 바 있다(US 5,019,504호). 이리  
유도제는 방어 기작과 관련된 유전자들을 활성화하는 동시에 p34cdc2 단백질 키나  
제 (p34cdc2 protein kinase)와 유사분열 시클린 (mitotic cyclin)과 같은 세포 주기  
조절과 관련된 유전자의 발현을 억제한다(Logemann et al., Plant Journal

865-876, 1995). 또한 옥수수의 병원균인 코크리오포투스 카보눔(*Cochliobolus  
rbonum*)이 생산하는 HC 독소는 히스톤 디아세틸레이즈(histone deacetylase)의 활  
을 저해하는 것으로 알려져 있다(Brosch et al., Plant Cell 7:1941-1950, 1995).

한편 부틸산 (Butyric acid) 또는 소듐 부티레이트는 히스톤 디아세틸레이즈  
저해제로서 히스톤 H3와 H4의 과아세틸화(hyperacetylation)를 일으킨다(Riggs et  
., Nature 263:462-464, 1977). 부틸산의 처리로 인한 히스톤의 아세틸화 증가는  
포의 염색체 구조 변화를 유도함으로써 전사 단계의 활성 증가를 가져오고, 세포  
화 상태의 변화에 영향을 미치는 것이 보고되었으며(Thorne et

.. Eur. J. Biochem. 183:701-713, 1990). 일부 세포에 있어서 세포 자멸사 (apoptosis)를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Bhatia et al., Cell Growth Diff. 6: 7-944, 1995). 상기와 같은 부틸산의 다양한 생리적 활성에 기초하여 일부에서는 배양 단백질의 발현을 증가시킬 목적으로 부틸산 또는 소듐 부티레이트를 동물세포 배양 배지에 처리하여 외래 유전자의 전사단계를 증가시키고 이로 인하여 외래 단백질의 발현 수준을 증가시키는 방법이 개발된 바 있다 (US 6,228,618호).

부틸산의 다양한 생리적 활성에도 불구하고 아직까지 식물과 식물세포배양에 대해 부틸산의 활성과 작용기작에 대한 연구는 많이 진행되지 않았으며, 일부 연구자들 의해 부틸산이 식물세포의 성장과 식물 조직이나 세포의 분화에 미치는 영향에 대해 연구가 진행되었을 뿐이다 (Tramontano and Scanlon, Phytochemistry 41:85-88, 96).

[발명이 이루고자 하는 기술적 과제]

본 발명의 목적은 식물세포배양에서 이차 대사 산물을 대량 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

또한 본 발명의 목적은 식물세포배양에서 이차대사산물의 생산성을 향상시키기 위하여 알카노산 및 알카노산 염 처리 농도, 처리 시기 및 반복 처리 횟수 등에 있어 적의 조건을 제공하는 것이다.

[발명의 구성 및 작용]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 배양 배지에 알카노산 또는 이의 염을 리하여 식물세포를 배양하는 단계를 포함하며, 상기 알카노산 또는 이의 염

식물세포의 이차대사산물의 생산성을 증가시키는 것을 포함하는 식물세포배양에 한 이차대사산물의 생산방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명자들은 다양한 식물세포배양에서 적용될 수 있는 효율적인 이차대사산물 생산성 향상 방법을 제공하기 위하여 연구를 거듭한 결과, 식물세포 배양을 위한 양 배지에 알카노산 또는 이의 염을 처리하면 식물세포에서 이차대사산물의 생산량 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

또한 식물세포배양에 알카노산 또는 이의 염을 비교적 높은 농도로 처리할 경우는 세포의 성장이 현격하게 저해되지만 적절한 농도의 알카노산 및 알카노산의 염 처리할 경우에는 세포의 성장이 오히려 촉진되며, 이와 더불어 이차대사산물의 생성도 향상된다는 것을 발견하고, 알카노산 및 알카노산의 염을 처리하는 방법을 최적화하여 식물세포배양에서 이차대사산물을 대량 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 명을 완성하였다.

식물로부터 생산할 수 있는 이차대사산물의 종류는 매우 광범위하며, 각 식물과 이로부터 생산되는 이차대사산물의 특성에 따라 생산에 적용되는 기술은 매우 양하다. 상기 이차대사산물과 이의 생산에 사용될 수 있는 식물 세포의 일예를 하 표 2로 나타낸다.

표 2]

이차산물	공능	식물 종
Ajmalicine	Antihypertensive	<i>Cath. roseus</i>
Artemisinin	Antimalarial	<i>Artemisia annua</i>
Ajmaline	-	<i>Ra. serpentina</i>
Acetidine	-	<i>Acotinus</i> spp.
Berberine	Intestinal ailment	<i>C. japonica</i>
Caaptothecin	Antitumour	<i>Caaptotheca acuminata</i>
Capsaicin	Counterirritant	<i>Ca. frutescens</i>
Castanospermine	Glycoside inhibitor	<i>Castanosperma australe</i>
Codeine	Sedative	<i>P. somniferum</i>
Colchicine	Antitumour	<i>Colchicum autumnale</i>
Digoxin	Heart stimulant	<i>Di. lanata</i>
Diosgenin	Steroidal precursor	<i>Dioscorea deltoidea</i>
Ellipticine	Antitumour	<i>Orchrosia elliptica</i>
Emetine	-	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>
Forsskolinn	Bronchial asthma	<i>Coleus forsskolii</i>
Ginsenosides	Health tonic	<i>Panax ginseng</i>
Morphine	Sedative	<i>P. somniferum</i>
Podophyllotoxin	Antitumour	<i>Podophyllum peltatum</i>
Quinine	Antimalarial	<i>Cinchon. ledgeriana</i>
Sanguinarine	Antiplaque	<i>Sanguinaria canadensis</i>
Shikonin	Antibacterial	<i>P. somniferum</i>
Taxol	Anticancer	<i>L. erythrorhizon</i>
Vincristine	Antileukemic	<i>Taxus</i> spp.
Vinblastine	Antileukemic	<i>Cath. roseus</i>

본 발명의 식물세포배양의 이차대사산물을 대량으로 생산하는 방법은 이차대사물을 생산하는 모든 식물세포에 적용할 수 있다. 바람직하게는 낮은 이차대사산물 생산성을 보이는 여러 식물세포, 특히 치료저항성 난소암 및 유방암의 치료에 유한 것으로 입증된 파클리탁셀의 생산에 이용되는 주목(*Taxus* genus) 세포 등에 적용으로써 이차대사산물의 생산성을 크게 향상시킬 수 있으며, 파클리탁셀의 산업적 생산에 이질 이용할 수 있다.

즉, 주목 속에 속하는 다양한 종의 주목 세포가 본 발명의 식물세포배양의 이차대사산물을 대량 생산하는 방법에 의해 이차대사산물의 생산성을 크게 향상시킬 수

다. 주목 속에 속하는 것으로는, 텍서스 바카타 (*Taxus bacata*), 텍서스 브레비폴리아 (*Taxus brevifolia*), 텍서스 카나덴시스 (*Taxus canadensis*), 텍서스 취넨시스 (*Taxus chinensis*), 텍서스 무스피다타 (*Taxus cuspidata*), 텍서스 플로리다나 0, 텍서스 글로보사 (*Taxus globosa*), 텍서스 메디아 (*Taxus media*), 텍서스 월리치아나 (*Taxus wallichiana*), 텍서스 유나넨시스 (*Taxus yunnanensis*)가 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 주목 속에 속하는 식물의 세포로부터 파클리탁셀 및 텍센 화합물 대량으로 생산할 수 있다.

구체적인, 본 발명의 식물세포배양의 이차대사산물을 대량 생산하는 방법은, 식물세포 배양 배지에 알카노산 또는 이의 염을 1종 이상 처리하여 식물세포를 배양하는 단계들을 포함한다.

상기 식물세포 배양 배지는 당분야에 널리 공지된 바와 같이, 영양분 및 식물세포의 생육력을 유지하는데 필요한 그 밖의 인자, 즉, 탄소원, 질소원, 염 및 비타민을 함유하고 있는 것일 수 있다. 또한 식물세포의 배양에 널리 사용되고 있는 배지들, 예를 들면 무라시게-스콧 배지 (Murashige & Skoog medium), 겐보그 배지 (Gamborg B5 medium), 린스마이어-스콧 배지 (Linsmaier & Skoog medium) 일 수 있으며, 필요에 따라 각종 첨가제를 가하거나 성분 중 일부를 제거하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

일례로, 텍서스 취넨시스 (*Taxus chinensis*)를 배양하여 파클리탁셀 및 텍센 화합물을 생산하는 경우, 카제인 가수분해물을 함유하는 B5 배지 (참조 : Gamborg et al., Can. J. Biochem., 45 : 417-421 (1968))나 상기 B5 배지에 60 g/L의 자당을 첨

한 변형 겐보그 배지를 사용할 수 있으며, 배지의 조성은 하기 표 3과 같다 (대한민

특허 제 0266448호 참조).

표 3)

성분	함량 (mg/L)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	113.23
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	3.0
KI	0.75
KNO <sub>3</sub>	2500
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	150
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2
이노시톨	10
니코틴산	1
원로제닌산·Ca-염	0.874
피리독신·HCl	1
리보플라빈	0.015
티아민·HCl	10
나프탈렌 하제트산	10 uM
벤질아미노퓨린	0.2 uM
카세인 가수분해물	500
AgNO <sub>3</sub>	1-15 uM
자당	60000

또한 본 발명에 따른 식물세포 배양 배지는 선택적으로 이차대사산물의 생산을 도하는 인자들을 포함한다. 이러한 인자들로는 식물 호르몬, 이차대사산물의 생합 전구체, 유도제 및 시그널 커플러 등이 있다. 배지에 첨가되는 이러한 인자들은 양한 경로를 통하여 식물세포의 이차대사산물 생산을 자극하며, 본 발명의 알카노

및 알카노산의 처리와 함께 이차대사산물 생산성 향상에 대한 시너지 효과를 일으  
수 있다.

일례로, 텍서스 취넨시스(*Taxus chinensis*) 세포배양을 통한 파클리탁셀 및 텍  
화합물의 생산에 있어서, 바람직한 유도제는 질산염이며, 바람직한 처리 농도는 1  
지 15  $\mu\text{M}$ 으로 배양 초기에 배지에 첨가되어 사용된다.

그 외, 식물세포의 배양방법 및 조건은 식물 세포의 종류에 따라 또는 이차대사  
물의 종류의 따라 공지 방법을 채택할 수 있다.

본 발명에 따른 알카노산은 단쇄상으로 연결된 탄소사슬의 말단에 카보닐기를  
지고 있는 화합물로서,  $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_2$ 의 화학식으로 표현된다. 상기  $n$ 은 1 내지 8의 정  
일 수 있으며, 바람직하기로는 3 내지 6의 정수이다. 알카노산의 염은 알칼리 금  
염일 수 있으며, 예컨대 나트륨(Na), 칼륨(K) 등이 적당하다. 텍서스 취넨시스  
*axus chinensis*) 세포배양에서 파클리탁셀 및 택센 화합물을 생산하는 경우, 부틸  
염 또는 프로피온산 염을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 소듐 부틸레이트 또는  
소듐 프로피오네이트를 사용할 수 있다.

알카노산 또는 알카노산의 염은 증류 또는 식물세포에서 히스톤 아세틸화물 증  
시켜 염색체의 구조 변화를 유도함으로써 식물세포의 주기를 조절하는 역할을 수행  
다. 특히 텍서스 취넨시스(*Taxus chinensis*) 세포배양에 일정 농도 이상의 소듐  
부틸레이트를 처리할 경우 세포의 성장이 중단되는 것이 관찰되며(도 1a), 상기 세  
의 게놈 DNA를 전기영동하는 경우 5  $\text{mM}$  농도의 소듐 부틸레이트를 처리 조건에서  
||도 예정사의 특징인 일정 크기의 밴드로 DNA 밴드가 나타난다(도 1c). 상기 결과  
텍서스 취넨시스(

*xus chinensis*) 세포에 소듐 부티레이트에 의해 염색체 구조 변화가 발생되었으

므로 인해 세포의 성장 중단과 세포 예정사를 불러 일으켰음을 의미한다.

알카노산 또는 이의 염은 배양 배지에 0.01 내지 500 mM로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.1 mM 내지 200 mM, 더욱 바람직하게는 0.1 mM 내지 20 mM로 포함될 있으나, 식물 세포의 종류에 따라 적절히 조절하는 것이 가장 바람직하다. 텍서 취넨시스(*Taxus chinensis*)는 알카노산 및 알카노산 염이 0.5 내지 10 mM로 포함 배지에서 배양할 수 있으며, 바람직하기로는 0.7 내지 1.5 mM이다. 특히 텍서스 넨시스(*Taxus chinensis*)는 1 mM 농도의 소듐 부티레이트가 포함된 배지에서 배하는 경우 세포 성장이 촉진되고 (도 1a), 파클리락셀 생산량이 크게 증가하여 대조와 비교하여 약 1.97 배 높은 생산성을 나타낸다 (도 1b).

본 발명에 따른 알카노산 또는 이의 염의 배지내 처리 시기는 식물세포를 배양지에 접종하기 이전에서 세포의 성장과 활성이 완료되는 시점까지일 수 있으며, 바람직하기로는 세포의 대수성장기 초기일 수 있다. 그러나 식물세포에 따라 알카노산 또는 이의 염의 처리 시기를 적절히 조절하는 것이 더욱 바람직하다. 예컨대 텍서 취넨시스(*Taxus chinensis*) 세포 배양시 알카노산 또는 이의 염은 세포 배양 후 0에서 배양 후 21일까지의 기간내에 배지에 처리할 수 있으며, 특히 바람직하게는 양 후 0일부터 14일까지의 기간내 처리할 수 있다.

알카노산 또는 이의 염은 식물세포의 생리적인 변화, 특히 히스톤 디아세틸레이의 활성 저해나 세포 주기 조절 관련 유전자의 발현 억제와 같은 변화를 유발한다. 이 변화는 가역적인 변화이다. 따라서, 배지내 알카노산 또는 이의 염이 갈되면, 변화된 식물 세포의 특성은 곧 원래의 상태로 환원된다. 이에, 알카노산



는 이의 염은 식물 세포 배양배지내 일정 농도로 존재하는 것이 좋다. 이를 위하여 배양 배지에 최초로 알카노산 또는 이의 염을 처리한 후 일정 간격으로 1회 이상씩 처리할 수 있으며, 바람직하기로는 배지내 알카노산 또는 이의 염의 농도가 0.1 내지 500 mM로, 바람직하게는 0.1 mM 내지 200 mM, 더욱 바람직하게는 0.2 mM 지 20 mM로 유지되도록 하는 것이 좋으나, 식물 세포의 종류에 따라 적절한 농도를 택하는 것이 가장 바람직하다. 텍세스 취넨시스(*Taxus chinensis*) 세포는 배양시 카노산 또는 이의 염을 1 내지 3회 배지내 처리할 수 있으며, 바람직하게는 2 내지 3이다.

식물세포의 배양 방법은 당업계에 널리 공지된 적절한 식물세포의 배양 방법이 두 사용될 수 있다. 그 예로는 회분식 배양(batch culture), 연속식 배양(continuous culture), 유가식 배양(fed-batch culture), 반연속식 회분 배양(semi-continuous batch process), 고정화 배양(immobilized culture), 이원상 배양(two-phase culture) 등이 있으며, 각 식물세포는 세포의 특성과 이차대사산물의 특에 따라 적절한 배양방법을 선택하여 사용할 수 있다.

본 발명에서는 일실시예로, 텍세스 취넨시스(*Taxus chinensis*) 세포를 본 발명 방법에 따라 배양하여 파클리탁셀 및 텍센 화합물을 생산하였다. 그 결과 파클리셀의 생산성은 약 6배 이상 증가하였으며, 텍센 화합물의 생산성은 각 텍센 화합물 종류에 따라 약 1.6 배에서 약 9 배까지 증가하였다.

본 발명의 방법은, 또다른 식물세포로서 비파(*Eriobotrya japonica*)의 세포배양서 인슐린 비의존형 (Type II) 당뇨병의 치료제로 사용할 수 있는 코로솔산(corsolic acid)의 생산성을 증가시킬 목적으로 적용될 수 있다.

또한 본 발명은 식물 세포 배양 배지 및 알카노산 또는 이의 염을 포함하는 식물 세포배양에 의한 이차대사산물 생산용 배지들 제공한다. 상기 알카노산 또는 이의 염은 배양 배지에 0.01 내지 500 mM로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.1 mM 내지 10 mM, 더욱 바람직하게는 0.1 mM 내지 20 mM로 포함될 수 있으나, 식물 세포의 종류에 따라 적절히 조절가능하는 것이 가장 바람직하다.

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 좀더 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

#### 실시예 1: 식물세포 배양에서 소디움 부티레이트의 처리 효과

##### 1-1. 식물 세포 성장 및 이차대사산물 생산을 측정

텍서스 취넨시스(*Taxus chinensis*) SYG-1 세포주 (KCTC-0232BP)를 파클리탁셀 생산 화합물을 생산하기 위한 세포로 이용하였다.

250 mL의 삼각플라스크에 60 g/L의 자당을 포함하는 배지 (대한민국 특허 제 66448호 참조)에서 14일간 배양한 SYG-1의 배양액 50 mL과, 50 mL와 30 g/L의 자당을 포함하는 배지에서 14일간 배양한 SYG-1의 배양액 50 mL을 각각 넣고, 암조건에서 4℃, 150 rpm으로 14일간 배양하였다. 이후 배양 온도를 29℃로 변경하여 28일간 양하였다. 또한 SYG-1의 파클리탁셀 생산성을 증가시키기 위하여 배양개시일로부터 7일째에 각각 0, 0.5, 1, 5 및 10 mM 농도의 소디움 부티레이트를 처리하고, 배양 4, 21, 28, 35, 42일째에 각각 일의 샘플을 취하여 세포의 성장경도와 파클리탁셀의 생산량을 측정하였다.

세포의 성장정도는 세포 건조중량(dry cell weight, DCW)의 측정을 통해 관찰한다. 세포 건조중량은 임의로 채취된 식물세포 배양액을 흡인여과기(Buchner funnel)을 이용하여 왓만 4번 여과지로 여과하여 얻은 세포를 60 ℃의 건조오븐에 24시간 동안 건조하여 측정한 중량이다.

또한 파클리락셀의 생산량은 당업계에 널리 공지된 파클리락셀 및 텍센 화합물 정량 방법 (대한민국 특허 제 0266448호 참조)으로 정량하였다.

소듐 부티레이트를 처리하여 배양한 SYG-1의 세포 성장정도 및 파클리락셀 생산을 도 1a와 도 1b에 도시하였다(도 1a 및 도 1b - □: 무처리구, ○: 0.5 mM 소듐 부티레이트, △: 1.0 mM 소듐 부티레이트, ◇: 5.0 mM 소듐 부티레이트, X: 10 mM 소듐 부티레이트).

0.5 mM의 소듐 부티레이트를 처리시, 세포 성장과 파클리락셀 생산은 큰 변화 없었으나, 1 mM의 소듐 부티레이트를 처리한 경우에는 배양 14일부터 세포의 성장도가 크게 증가하며, 배양 28일에는 23.22 g/L로 최고 성장에 도달한 뒤 점차 감소하였다. 그러나 5 mM과 10 mM 농도의 소듐 부티레이트를 처리했을 때에는 세포 성장이 전혀 이루어지지 않고 세포의 색깔이 흑갈색으로 변하며 세포괴사가 일어난다. 또한 1 mM의 소듐 부티레이트를 처리조건에서 배양 35일에 최대 133.8 mg/L의 소듐 부티레이트를 처리하지 않은 대조구보다 1.97배 많은 양의 파클리락셀을 산하였다.

#### 1-2. 세포내 변화 측정

또한 0.1 및 5 mM의 소듐 부티레이트 처리조건에서 배양한 텍서스 취넨시스 G-1 세포 1 g (Fresh weight)을 게놈 DNA 추출 키트 (DNeasy Plant Mini Kit, AGEX, 미국)를 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 추출한 게놈 DNA 250 ug은 아가즈 겔에 전기영동하였다 (도 1c). 도 1c에서, 레인 A는 사이즈 마커이고, 레인B는 처리구이고, 레인C는 1 mM 소듐 부티레이트 처리구이고, 레인D는 5 mM 소듐 부티레이트 처리구이다.

5 mM의 소듐 부티레이트 처리조건에서, 세포의 성장은 중단되는 것으로 도 1a에서 확인되었으며, 게놈 DNA를 전기영동한 결과 세포 자멸사의 특징인 일정 크기의 수로 DNA 밴드가 나타나는 것을 볼 수 있었다. 즉 텍서스 취넨시스 (*Taxus incensis*) 세포가 배지에 처리된 소듐 부티레이트의 영향으로 염색체의 구조 변화 일으켰으며, 이로 인해 세포의 성장 중단과 세포 자멸사를 불러 일으켰음을 알 수 있다.

#### 실시예 2: 소듐 부티레이트 처리 시기 결정

텍서스 취넨시스 SYG-1 세포를 배양하고, 1 mM 농도의 소듐 부티레이트를 각 배양개시일, 배양 7일, 배양 14일 배양 21일에 처리한 뒤, 배양 14, 21, 28, 35, 일제에 각각 임의의 샘플을 취하여 세포의 성장정도와 파클리탁셀의 생산량을 상기 실시예 1의 방법에 따라 측정하였다.

도 2a는 소듐 부티레이트의 처리시기에 따른 세포 성장정도를 나타낸 것이고, 2b는 파클리탁셀 생산량의 변화를 도시한 것이다 (도 2a 및 도 2b - □: 무처리구, : 배양후 0일 1 mM 소듐 부티레이트 처리구, △: 배양후 7일 1 mM 소듐 부티레

트 처리구, ◇: 배양후 14일 1 mM 소듐 부티레이트 처리구, X: 배양후 21일 1 mM 소듐 부티레이트 처리구).

텍서스 취넨시스 SYG-1은 1 mM의 소듐 부티레이트 처리 조건에서 소듐 부티레이트 처리시기에 관계없이 무처리구에 비하여 따른 성장을 나타내었다. 또한 파클리탁셀의 생산량은 1 mM의 소듐 부티레이트를 배양 후 7일에 처리했을 때에 가장 높은 파클리탁셀 생산량을 보였다.

도 2a의 결과를 바탕으로 1 mM 소듐 부티레이트의 처리 시기에 따른 텍서스 취넨시스 SYG-1의 최대 비성장속도를 구하였고, 이는 하기 표 4에 나타내었다. 최대 성장속도는 소듐 부티레이트의 처리시기가 빠를수록 높았으며, 최대 세포조건중에 도달하는 시간도 빨라졌다. 그러나 최대 세포조건중량은 배양 후 7일에 1 mM의 소듐 부티레이트를 처리하였을 때에 23.22 mg/L로 가장 높았다.

표 4)

처리 조건	최대 비성장속도 ( $\mu_{max}$ )
무처리구 (대조구)	0.035
배양 0일	0.078
배양 7일	0.068
배양 14일	0.038
배양 21일	0.039

### 실시예 3 : 소듐 부티레이트의 반복 처리

상기 실시예 1-1의 방법과 같이 텍서스 취넨시스 SYG-1 세포를 배양하면서 1 mM 소듐 부티레이트를 배양 후 1일과 배양 후 15일에 각각처리하고, 7일 간격으로 일 농도의 소듐 부티레이트를 최대 3회 반복 처리하였다. 배양 후 30일과 37일 파클리탁셀의 생산량을 측정하였다(도 3 - □: 배양후 30일, ▣: 배양후 37일).

그 결과, 파클리탁셀의 생산성은 소듐 부티레이트 처리 횟수에 따라 증가하였다. 1 mM의 소듐 부티레이트를 3회까지 반복 처리하는 경우 배양 37일에 대조구에 비해 6.43배 높은 파클리탁셀 생산성을 나타내었고, 배양 후 15일에 1 mM의 소듐 부티레이트를 처리하고 3회 반복 처리하는 경우 2회 반복 처리시에 가장 높은 파클리탁셀의 생산성, 즉 대조구에 비해 4.95배 증가를 나타내었다.

#### 실시예 4 : 소듐 부티레이트의 처리에 의한 택센 화합물의 생산

상기 실시예 1-1의 방법과 동일하게 텍서스 취낸시스 SYG-1 세포를 배양하였고, 배양 후 7일 및 14일에 각각 1 mM 농도의 소듐 부티레이트를 처리하였다. 배양 후 8일, 36일 및 43일에 배양액을 일부 취하여 택센 화합물의 생산량을 측정하였다.

도 4는 택센 화합물의 생산량(대조구와 비교하여 택센 화합물의 생산량이 증감 비율을 % 단위로 계산함)을 나타낸 것으로, □는 28일간 배양한 것이고, ▢는 36일간 배양한 것이고, ■는 43일간 배양한 것이고, A는 BacIII이고, B는 10-DAT이고, C는 탁컬틴(Taxcultine)이고, D는 세팔로람민(Cephalorammin)이고, E는 13-디아세틸 킨닌 I (13-Deacetyl taxchinin I)이고, F는 파클리탁셀이고, G는 벤질 유도체 enzyI analog)이고, H는 H4이다.

도 4에서, 소듐 부티레이트의 처리에 의해 모든 택센 화합물의 생산이 크게 증가하였으며, 특히 28일간 배양시 대조구에 비하여 약 1.6 배 내지 약 9 배로 생산이 크게 증가하였다. 그러나 배양 후 36일에는 그 증가폭이 1 내지 3 배로 약간 줄어들었으며, 배양 후 43일에는 그 증가폭이 더욱 줄었다. 이는 소듐 부티레이트에 의한 이차대사산물의 생산성 증가 효과가 일종의 유도 효과(induction effect)에서, 지속적이지 않으며 소듐 부티레이트 처리 후 일정시간 동안 이차대사산물의

산이 유도된 후 다시 원래의 상태로 돌아가는 경향을 보임을 알 수 있다. 또한 소  
음 부티레이트에 의한 생산성 증가 현상이 파클리탁셀에만 한정되는 것이 아니라  
든 이차대사산물에 일반적으로 적용되는 것임을 알 수 있다.

#### 실시에 5 : 소듐 프로피오네이트의 처리

텍서스 취넨시스 SYG-1 세포를 배양하면서 배양후 7일 및 14일에 각각 0.5 또는  
1 mM 소듐 프로피오네이트를 처리한 후 배양을 계속하였다.

도 5a는 소듐 프로피오네이트 처리 조건에서의 텍서스 취넨시스 SYG-1 세포의  
성장도를 나타낸 것이고, 도 5b는 파클리탁셀의 생산성을 나타낸 것이다 (도 5a 및  
5b - □: 무처리구, ○: 7일간 배양후 0.5 mM 소듐 프로피오네이트 처리구, △:  
양후 7일 및 14일에 0.5 mM 소듐 프로피오네이트 처리구, ●: 7일간 배양후 1 mM  
소듐 프로피오네이트 처리구, ▲: 배양후 7일 및 14일에 1 mM 소듐 프로피오네이  
트 처리구).

소듐 프로피오네이트 처리조건에서, 텍서스 취넨시스 SYG-1 의 세포 성장은  
가하였으며, 소듐 프로피오네이트의 처리 농도 1 mM 조건에서 또한 2회 반복 처  
리 세포 성장이 빠른 것으로 확인되었다.

파클리탁셀은, 소듐 프로피오네이트 처리 농도가 높을수록, 처리횟수가 많을  
수록 생산율이 증가되었다.

상기 결과로, 소듐 부티레이트 이외의 알카노산 또는 이의 염 역시 식물세포  
양시 이차대사산물의 생산을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

#### 실시에 6: 다양한 알카노산의 영향

텍서스 취넨시스 SYG-1 세포를 배양하고, 배양 7일 경과시 소듐 포르메이트  
1), 소듐 아세테이트 (C2), 소듐 프로피오네이트 (C3), 소듐 부티레이트 (C4)  
발레르산 (C5)을 각각 1 mM 농도로 배지에 첨가하고 27일간 배양하였다.

도 6은 소듐 포르메이트 (SF), 소듐 아세테이트 (SA), 소듐 프로피오네이  
(SP), 소듐 부티레이트 (SB) 또는 발레르산 (VA)이 1 mM 첨가된 배지에서 배양한  
서스 취넨시스 SYG-1 세포의 파클리락셀의 생산량을 나타낸 것으로, 탄소원자 1 내  
5개를 포함하는 알카노산 염은 파클리락셀의 생산을 증가시켰다.

#### 실시에 7: 코로솔산의 생산

전라남도 완도 지방에 자생하는 비파 (*Eriobotrya japonica*) 식물체로부터 캘러  
및 현탁배양을 유도하였다.

채취한 잎에 70% 에탄올을 60초간, 1% 차아염소산나트륨을 20분간 처리한 후 멸  
증류수로 3회 세척하여 표면살균을 실시하였다. 이후 0.7% 한천을 포함하는 실시  
1-1의 배양배지에 치상하여, 24℃, 암조건에서 배양하였다. 배양 3-4주 후에 유  
된 캘러스를 한천을 포함하지 않는 액체 배양 배지로 옮겨 24℃, 암조건에서 120  
μ으로 현탁배양을 실시하였다. 확립된 비파의 현탁배양세포는 상기 배양배지에서  
2 주 간격으로 계대 유지하였다.

비파 현탁배양 세포의 배지에 0.5 mM의 소듐 부티레이트를 처리한 후 비파 세  
를 14일간 배양하여 코로솔산의 생산을 확인하였다. 코로솔산의 추출 방법은 상기  
실시에 1-1의 파클리락셀 및 텍센 화합물의 정량 방법에 따랐으며, 코로솔산의 검출



40-80% 아세토나이트릴 용매를 1 ml/분 유속으로 흘려주면서 210 mM의 파장에서 광도를 측정하였다.

도 7a 및 b는 비파 현탁배양액 (도 7a)과 0.5 mM의 소디움 부틸레이트에서 배양 비파 현탁배양액 (도 7b)의 HPLC 차트로, 20.1분의 머무름 시간에서 코로솔산의 피크가 검출되었으며, 0.5 mM의 소디움 부틸레이트 처리 조건에서 코로솔산의 생산은 2배 증가하였다.

#### 발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 식물세포배양에서 이차대사산물의 생산을 크게 증가시킬 수 있는 물질인 알카노산 또는 이의 염을 이용한 식물세포로부터 이차대사산물을 대량으로 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 따르면 생산성이 매우 낮은 것으로 알려진 식물세포의 이차대사산물의 생산성을 크게 향상시킬 수 있으므로, 파클리탁셀, 코로솔산 등의 산업적으로 유용한 식물기원 이차대사산물 생산 확립에 크게 기여할 수 있다.

특허청구범위}

청구항 1]

배양 매지에 화학식 1로 표시되는 알카노산 또는 이의 염을 처리하여 식물세포 배양하는 단계들 포함하며,

상기 알카노산 또는 이의 염은 식물세포의 이차대사산물의 생산성을 증가시키는 것을 포함하는 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산방법:

(화학식 1)



상기 화학식 1에서, n은 1 내지 9의 정수이다.

청구항 2]

제 1항에 있어서, 상기 식물세포는 주목 속(*Taxus* genus) 식물 또는 비파 (*iobotrya japonica*)로부터 유도된 식물세포인 방법.

청구항 3]

제 2항에 있어서, 상기 주목 속 식물은 텍서스 바카타 (*Taxus bacata*), 텍서스 레비폴리아 (*Taxus brevifolia*), 텍서스 카나덴시스 (*Taxus canadensis*), 텍서스 넨시스 (*Taxus chinensis*), 텍서스 쿠스피다타 (*Taxus cuspidata*), 텍서스 플로리다나 (*Taxus floridana*), 텍서스 글로보사 (*Taxus globosa*), 텍서스 메디아(*Taxus dia*), 텍서스 월리치아나 (*Taxus wallichiana*) 및 텍서스 유나덴시스 (*Taxus nnaensis*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

부구항 4]

제 1항에 있어서, 상기 이차대사산물은 파클리탁셀, 택센 화합물 또는 코르솔산 방법.

부구항 5]

제 1항에 있어서, 상기 알카노산은 프로피온산 또는 부틸산인 방법.

부구항 6]

제 1항에 있어서, 상기 알카노산 염은 알카노산 알칼리 금속염인 방법.

부구항 7]

제 1항에 있어서, 상기 알카노산 또는 이의 염은 배양배지에 0.1 내지 20 mM로 리되는 것인 방법.

부구항 8]

제 1항에 있어서, 상기 알카노산 또는 이의 염은 식물세포 배양일 내지 배양일 부터 21일 경과기에 처리하는 것인 방법.

부구항 9]

제 1항에 있어서, 상기 알카노산 또는 이의 염은 1회 내지 5회 반복 처리되는 인 방법.

부구항 10]

식물 세포 배양 배지 및 0.1 내지 20 mM의 화학식 1로 표시되는 알카노산 또는 의 염을 포함하는 식물세포배양에 의한 이차대사산물 생산용 배지:

( 화학식 1)



상기 화학식 1에서, n은 1 내지 9의 정수이다.

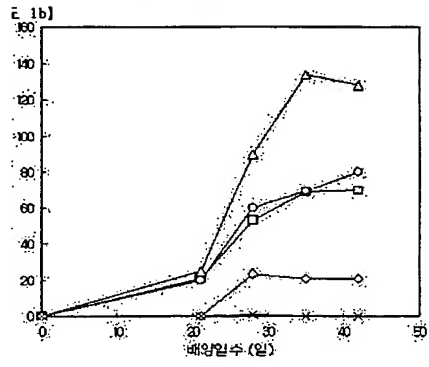
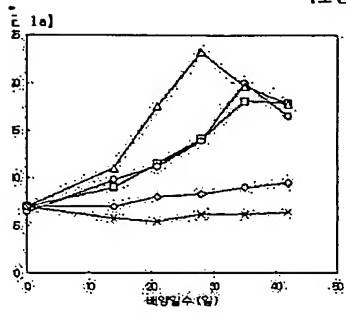
영구항 11]

제 10항에 있어서, 상기 식물은 텍서스 바카타 (*Taxus bacata*), 텍서스 브레비아 (*Taxus brevifolia*), 텍서스 카나덴시스 (*Taxus canadensis*), 텍서스 취넨시 (*Taxus chinensis*), 텍서스 쿠스피다타 (*Taxus cuspidata*), 텍서스 플로리다나 (*Taxus floridana*), 텍서스 글로보사 (*Taxus globosa*), 텍서스 메디아 (*Taxus media*), 텍서스 월리치아나 (*Taxus wallichiana*), 텍서스 유나넨시스 (*Taxus yunnanensis*) 및 파 (*Eriobotrya japonica*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 배지.

영구항 12]

제 10항에 있어서, 상기 이차대사산물은 파클리탁셀, 텍센 화합물 또는 코르솔인 배지.

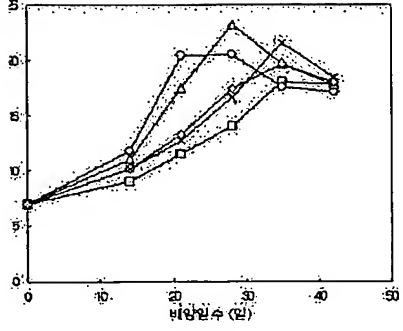
[도면]

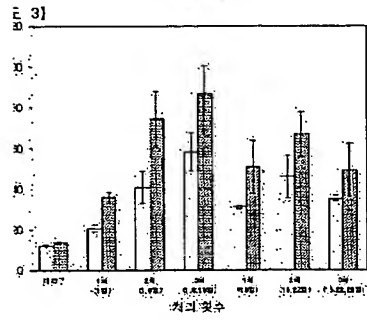
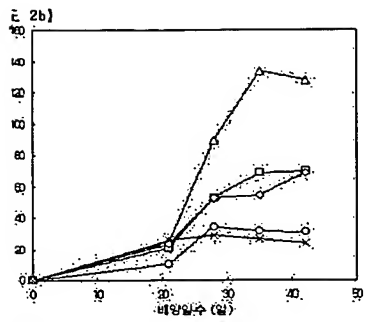


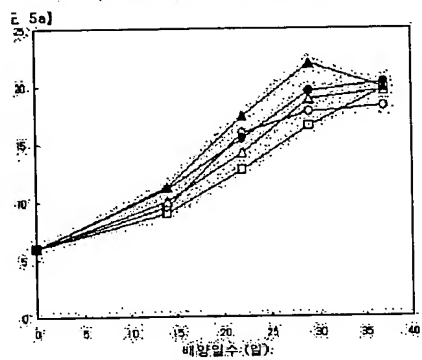
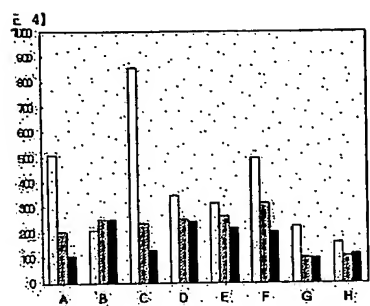
E 1c]



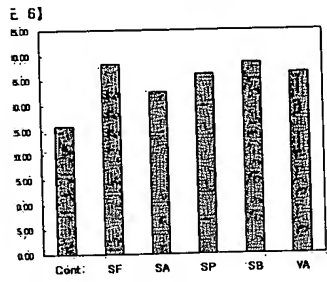
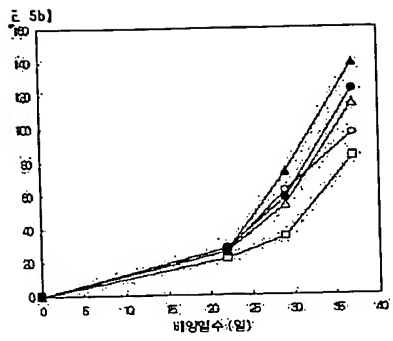
E 2a]

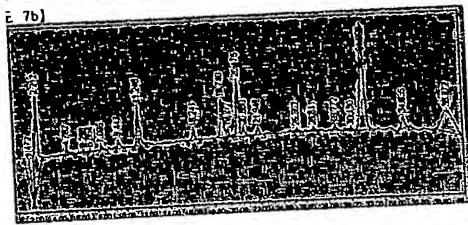
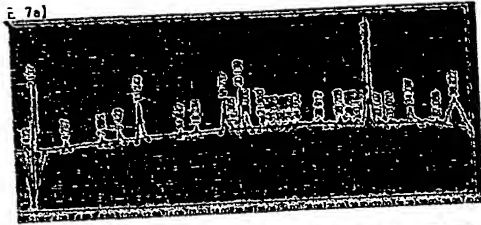












33-33

BEST AVAILABLE COPY